

原 著

グリアジンの経口投与量が小麦依存性運動誘発
アナフィラキシーに与える影響田中守^{*1} 矢野博己^{*2} 山田作夫^{*3,4} 長野隆男^{*3}

要 約

本研究ではグリアジンの経口投与量がマウスの小麦依存性運動誘発アナフィラキシー（WDEIA）に与える影響について検討した。B10.Aマウスにグリアジン画分を含むアルミニウムアジュバントを7日毎に計6回腹腔内投与し、感作マウスを作製した。血清中グリアジン特異IgEはELISA法により求めた。感作マウスを4群に分け0.1 mg, 0.2 mg, 0.4 mg, 0.8 mgのグリアジン画分を経口投与後、30分間の安静もしくはトレッドミル運動（傾斜20%, 速度15 m/分）を負荷し、その後直腸温と自発運動量をアナフィラキシーの指標として測定した。グリアジン特異IgE値は、非感作群と比較してグリアジン感作群で有意な上昇が認められた。安静時のアナフィラキシー評価では、体温は非感作群と比較して0.8 mg投与群で有意な低下が認められ、自発運動量は0.4 mg投与群, 0.8 mg投与群で有意に低下した。運動負荷によるアナフィラキシーは、0.1 mg投与群, 0.2 mg投与群でも観察された。以上の結果から、グリアジン感作マウスにおけるアナフィラキシー症状は、アレルゲン投与量依存的に惹起されるが、運動は低容量グリアジン投与によるアナフィラキシーの惹起を促進させると考えられた。

1. 背景

食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）は原因食品の摂取のみでは症状がみられず、運動が加わった場合に限り症状が誘発される食物アレルギーの特殊病型である^{1,2)}。FDEIAのアレルギー症状は、基本的にIgEを介したI型アレルギーに基づく反応と考えられている³⁾。FDEIAの原因食品としては世界的に小麦が多く、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー（WDEIA）との病名が用いられている⁴⁾。とりわけ本邦では、小麦はFDEIAの症例中57%を占める³⁾。

小麦タンパク質は溶解性の違いによって、4つに大別される。即ち、水/塩可溶性のアルブミンとグロブリン、不溶性タンパク質のグリアジンとグルテニンに分類される。グリアジンとグルテニンは、小麦全タンパク質の80%とほぼ大部分を占めるグルテンの主なタンパク質である⁵⁾。グリアジンは皮膚試験や小麦タンパク質と患者血清中IgEとの反応性から、WDEIAの主要アレルゲンとして報告されている⁶⁻⁸⁾。このように、WDEIAの検討については長年

の間、小麦に関する疾患を持つ患者の血清が用いられてきた。

アナフィラキシー症状の評価、発症メカニズムの解明を行う上で、食物アレルギー動物モデルは必要不可欠のものとなっている。我々は以前、卵白に含まれるアレルゲンの1つであるリゾチームを用いたFDEIAのモデルマウスを提示した⁹⁾。さらに、このFDEIAのモデルマウスを用いて、溶解度の異なる3つの小麦タンパク質（塩溶性タンパク質画分、グリアジン画分、グルテニン画分）がWDEIAに与える影響について調べた¹⁰⁾。その結果、小麦タンパク質の中でグリアジン次いでグルテニンがマウスの実験系でもWDEIAの主要アレルゲンであることを報告した。しかし、どの程度のグリアジン量を投与すればアナフィラキシー症状は惹起されるのか不明な点が多い。また、なぜ運動がWDEIAの誘発因子になるのか、グリアジンの経口投与量とWDEIAとの関連についての未だ報告されていない。WDEIAの発症にはグリアジンの摂取量及び吸収量が大きく影響すると思われる。WDEIA患者血

*1 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康科学専攻 *2 川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

*3 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 *4 川崎医科大学 微生物学教室

（連絡先）長野隆男 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-Mail: naganot@mw.kawasaki-m.ac.jp

清中にはグリアジンに対する特異IgEが検出されることから⁶⁻⁸⁾、WDEIA症状はグリアジン投与量依存的に惹起されるのではないかと考えた。そこで本研究では、グリアジン感作マウスを作製し、グリアジンの経口投与量がWDEIAに与える影響を検討した。

2. 実験材料及び方法

2.1 グリアジン画分の調製

50 gの薄力粉（フラワー；日清製粉）に500 mlの0.5 M塩化ナトリウム（特級；ナカライテクス）溶液を加え、室温で2時間攪拌し、遠心分離（1,700 × g, 15分）を行い、塩溶性タンパク質を除いた。次に、残渣に500 mlの蒸留水を加え、室温で2時間攪拌し、遠心分離（1,700 × g, 15分）を行った。この作業を2回繰り返す、水溶性タンパク質及び塩類を除いた。残渣に500 mlの70%エタノール（特級；ナカライテクス）を加え、4℃で2時間攪拌し、遠心分離（1,700 × g, 15分）してエタノール抽出液を得た。エタノール抽出液を、透析膜（径21.4 mm；三光純薬）に入れ、スターラーで攪拌しながら30倍の1%酢酸溶液中で4℃、60時間透析をおこなった。透析外液は、1日目は2～3時間毎に、それ以降は1日につき2～3回交換した。透析内液を凍結乾燥機にて凍結乾燥し、グリアジン画分を得た。

2.2 感作マウスの作製

4週齢のB10.A/SgSnSlc（日本エスエルシー）雌マウス（体重15～20 g）48匹を下記の実験に用いた。実験期間中の飼育期間はMF飼料（オリエンタル酵母工業）と水を自由摂取させた。室温20 ± 2℃, 12/12h（A.M.8：00- P.M.8：00）の明暗サイクルの条件で飼育した。全ての実験は、動物実験ガイドラインに従い、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：09-004）。

グリアジン画分に0.1 M酢酸を加え10 mg/ml濃度のグリアジン溶液を作った。その後、PBSで1 mg/ml濃度までゆっくり希釈し、等量のImject Alum（Pierce Chemical）を加え、氷水中で超音波処理（70% duty cycle, 強さ5, 1分）を行った。グリアジン感作群（n=32）は1匹あたり、初回は0.2 ml/匹（グリアジン画分量 100 μg/匹）、2回目以降は、グリアジン画分量が初回の半分（グリアジン画分量 50 μg/0.2 ml/匹）を、吸入麻酔剤を用いて軽く麻酔をかけたB10.Aマウスの腹腔内に注射針・26G × 1/2"（Terumo）を用いて、1週間おきに6回免疫した。なお、非感作マウス（n=16）はPBSに等量のImject Alumと上記の条件で超音波処理したもの

を腹腔内投与した。腹腔内投与2日後に、軽い麻酔下で感作マウスの静脈から採血を行い、血液を遠心分離（700 × g, 15分）し、血清を得た。この血清に等量のグリセリン（特級；和光純薬工業）を加え、以後の実験で使用するまで-30℃で保存した。

2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウス特異IgEの測定は、Engvallら¹¹⁾の方法に従ってELISA法でおこなった。グリアジン画分溶液を10 μg/mlになるように、3 M尿素（特級；和光純薬工業）を含む50 mMの炭酸バッファー（pH 9.6）に溶かし、100 μlずつ96ウェルマイクロプレート（NUNC）の各ウェルに入れ、37℃で1時間静置した。各ウェルを0.05%のTween20（和光純薬工業）を含むPBS（PBS-T）で3回洗浄し、次に1%BSA/PBS-Tを100 μlずつ加え、37℃で1時間タンパク質未結合部分をブロックした。PBS-Tで3回洗浄した後、1%BSA/PBS-Tを100 μlずつ入れ、一次抗体として各血清サンプルを、濃度が50倍希釈になるように各ウェルに入れ、37℃で1時間インキュベートした。PBS-Tで5回洗浄した後、二次抗体としてPOD-linked anti-mouse IgE（Nordic Immunological）を1000倍希釈になるように、1%BSA/PBS-Tに溶かし、各ウェルに100 μlずつ加え、37℃で1時間インキュベートし、PBS-Tで5回洗浄した。合成基質である *o*-phenyldiamine（一級；和光純薬工業）2 mgを5 mlのクエン酸バッファーに加え、さらにH₂O₂（特級；和光純薬工業）を0.006%加えたものを、各ウェルに100 μlずつ入れ、約5分発色させ、2.5 mol/L H₂SO₄溶液を50 μl添加して酵素反応を停止させた。MODEL 550 MICROPLATE READER（Bio-Rad Laboratories）を用いて、492 nmの吸光度を測定した。

2.4 アナフィラキシー症状の判定

グリアジン感作マウスを0.1 mg投与群（n=9）、0.2 mg投与群（n=9）、0.4 mg投与群（n=7）と0.8 mg投与群（n=7）の4群に分けた。グリアジン感作マウスにそれぞれ吸入麻酔剤を用いて軽く麻酔をかけ、フィーディングニードル専用シリンジ（Popper）を用いて、グリアジン画分（タンパク質0.1 mg, 0.2 mg, 0.4 mg, 0.8 mg/1 mM酢酸, 0.5 ml/匹）をそれぞれ胃内投与（非感作群（n=16）は1 mM 酢酸0.5 mlのみ投与）・トレッドミル運動負荷を与えない条件と運動負荷を与える条件に分けた。運動負荷を与えない群は、ケージ内で30分放置した。運動負荷を与える群は、傾斜角20%、速度15 m/分、時間30 分の中等度の運動負荷条件で行っ

た. その後, 体温はデジタル体温計 (佐藤計量器) を用いて試料投与・運動負荷前後の直腸温を測定した.

自発運動量は P.M.8:00 から 1 時間毎に, 翌日 A.M.11:00 まで 15 時間, 回転ケージ (夏目製作所) を用いて測定した. 回転軸にケージの回転数を記録するカウンター (夏目製作所) を設置した.

2.5 統計処理

測定値は平均±標準誤差で示した. 統計ソフトは PASW Statistics 18 を使用した. 独立した 2 群の差の検定には Student の *t* 検定を用いた. 独立した多群の差の検定には一元配置の分散分析 (ANOVA) を, 継時的変化の検定には重複測定分散分析法 (repeated measure ANOVA) を用い, その後 Post hoc 検定として Tukey 検定を用いた. 危険率は 5% 未満を採用した.

3. 結果

3.1 血清抗グリアジン特異 IgE 値

感作群の血清グリアジン特異 IgE 値は, 非感作群の値と比較して有意な上昇が認められた ($p < 0.01$, 図1).

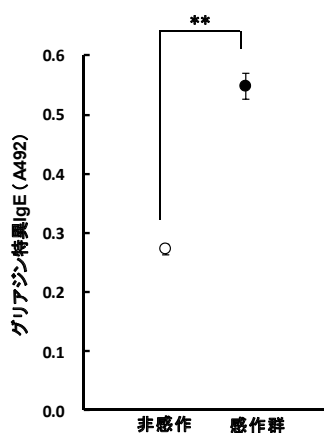


図1 グリアジン画分で感作した B10.A マウスの血清中グリアジン特異 IgE 値.

グリアジン特異 IgE 値は吸光度 (492 nm) で表した. ○: 非感作群 ($n=16$), ●: 感作群 ($n=32$). ** $p < 0.01$.

3.2 アナフィラキシー評価

運動負荷を与えない条件のアナフィラキシー評価

グリアジン画分投与後のアナフィラキシーの指標として直腸温 (図2) と自発運動量 (図3) を測定した. 直腸温は, 0.1 mg 投与群 ($37.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$), 0.2 mg 投与群 ($36.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$), 0.4 mg 投与群 ($36.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$) で, 非感作群 ($37.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$) と比較して有意な低下が観察されなかった. 一方, 0.8 mg 投与群 ($36.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$) は, 非感作群と比較して直腸温の有

意な低下が観察された ($p < 0.05$).

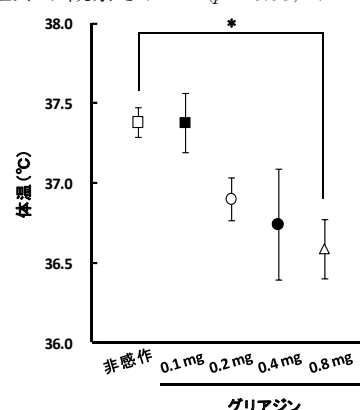


図2 グリアジン画分投与後の直腸温の比較.

感作マウスにグリアジン画分を投与後の直腸温を, デジタル体温計を用いて測定した. □: 非感作前 ($n=16$), ■: 0.1 mg 投与群 ($n=9$), ○: 0.2 mg 投与群 ($n=9$), ●: 0.4 mg 投与群 ($n=7$), △: 0.8 mg 投与群 ($n=7$). * $p < 0.05$.

1 時間毎の平均回転数を見ると (図3), 0.2 mg 投与群の 1 時間毎の平均回転数は, 非感作群の 1 時間毎の平均回転数と比較して開始測定時から 5 時間にわたり低下傾向を示し, 2 時間で有意な低下が認められた. 0.4 mg 投与群の 1 時間毎の平均回転数は, 非感作群の 1 時間毎の平均回転数と比較して開始測定時から 9 時間にわたり低下傾向を示し, 1-2 時間で有意な低下が認められた. 0.8 mg 投与群の 1 時間毎の平均回転数は, 非感作群の 1 時間毎の平均回転数と比較して開始測定時から 9 時間にわたり低下傾向を示し, 1-2, 5, 7-8 時間で有意な低下が認められた.

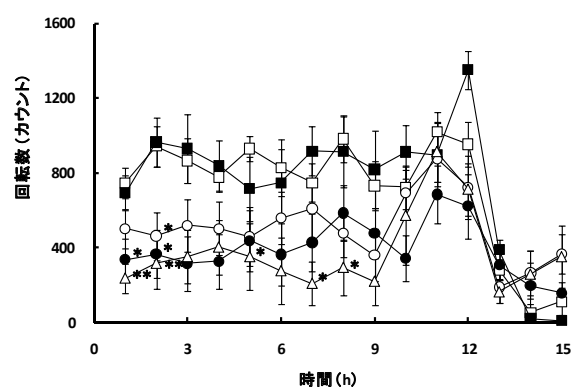


図3 グリアジン画分投与後の 1 時間毎の自発運動量の比較.

感作マウスにグリアジン画分を投与後に回転ケージを用いて P.M.8:00 ~ A.M.11:00 までの計 15 時間, 1 時間毎の回転数を測定した. □: 非感作前 ($n=16$), ■: 0.1 mg 投与群 ($n=9$), ○: 0.2 mg 投与群 ($n=9$), ●: 0.4 mg 投与群 ($n=7$), △: 0.8 mg 投与群 ($n=7$). 非感作群 vs 0.2 mg 投与群, 0.4 mg 投与群, 0.8 mg 投与群, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

自発運動量は、0.1 mg投与群 ($104 \pm 13\%$) と0.2 mg投与群 ($71 \pm 9\%$) で、非感作群 ($100 \pm 6\%$) と比較して自発運動量の有意な低下は観察されなかった。一方、0.4 mg投与群 ($56 \pm 13\%$) と0.8 mg投与群 ($53 \pm 14\%$) は、非感作群と比較して有意な低下が観察された ($p < 0.05$, 図4)。

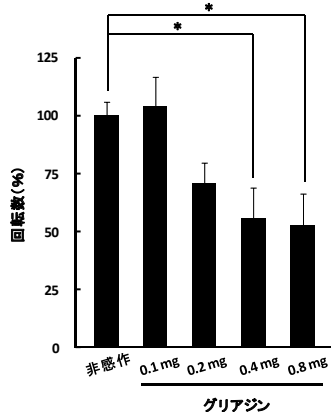


図4 グリアジン画分投与後の自発運動量の比較。

感作マウスにグリアジン画分を投与後に回転ケージを用いてP.M.8:00～A.M.11:00までの計15時間の回転数を測定した。非感作：非感作群 (n=16), 0.1 mg：0.1 mg投与群 (n=9), 0.2 mg：0.2 mg投与群 (n=9), 0.4 mg：0.4 mg投与群 (n=7), 0.8 mg：0.8 mg投与群 (n=7)。* $p < 0.05$ 。

3.3 運動負荷を与える条件のアナフィラキシー評価

グリアジン画分投与、運動負荷後のアナフィラキシーの指標として直腸温 (図5) と自発運動量 (図6) を測定した。直腸温は、0.1 mg投与群 ($37.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$) と0.2 mg投与群 ($37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$) で、非感作群 ($38.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$) と比較して有意な低下が観察された ($p < 0.01$)。

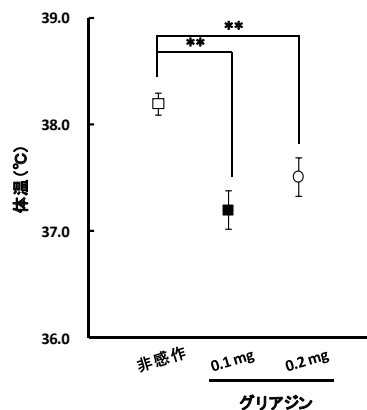


図5 グリアジン画分投与、運動負荷後の直腸温の比較。

感作マウスにグリアジン画分を投与、運動負荷後の直腸温を、デジタル体温計を用いて測定した。□：非感作前 (n=16), ■：0.1 mg投与群 (n=8), ○：0.2 mg投与群 (n=9)。* $p < 0.05$ 。

1時間毎の平均回転数を見ると (図6), 0.2 mg投与群の1時間毎の平均回転数は、非感作群の1時間毎の平均回転数と比較して開始測定時から12時間にわたり低下傾向を示し、1, 3-5, 8-9, 12時間で有意な低下が認められた。

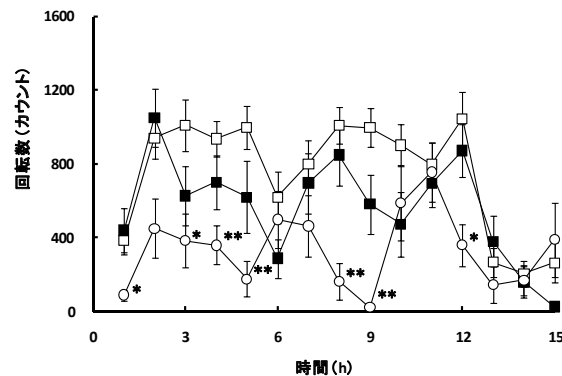


図6 グリアジン画分投与、運動負荷後の1時間毎の自発運動量の比較。

感作マウスにグリアジン画分を投与、運動負荷後に回転ケージを用いてP.M.8:00～A.M.11:00までの計15時間、1時間毎の回転数を測定した。□：非感作前 (n=16), ■：0.1 mg投与群 (n=8), ○：0.2 mg投与群 (n=9)。非感作群 vs 0.2 mg投与群, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

自発運動量は、0.1 mg投与群 ($74 \pm 9\%$) と0.2 mg投与群 ($47 \pm 9\%$) で、非感作群 ($100 \pm 5\%$) と比較して有意な低下が観察された (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, 図7)。

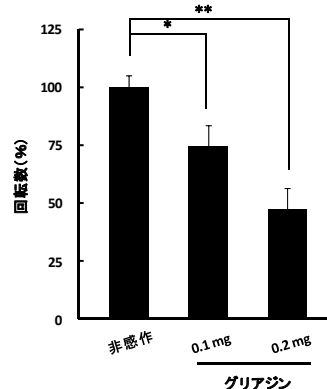


図7 グリアジン画分投与、運動負荷後の自発運動量の比較。

感作マウスにグリアジン画分を投与、運動負荷後に回転ケージを用いてP.M.8:00～A.M.11:00までの計15時間の回転数を測定した。非感作：非感作群 (n=16), 0.1 mg：0.1 mg投与群 (n=8), 0.2 mg：0.2 mg投与群 (n=9)。* $p < 0.05$ 。

4. 考察

WDEIAは、小麦製品摂取後に運動負荷などの二次的要因が加わることにより発症するアナフィラキシーと報告されているが^{1,2)}、これまでグリアジンの経口投与量とWDEIAとの関連について報告はない。

マウスを用いたアナフィラキシー症状の判定方法としては、これまでに血圧の測定^{12,13)}、呼吸数¹²⁾、体温^{12,14-26)}、自発運動量の測定²⁷⁾による報告や、アナフィラキシー症状の肉眼観察による判定方法²⁸⁾などが報告されている。本研究では、アナフィラキシー症状の判定方法として一般的によく用いられている直腸温と自発運動量を採用した。Makabe-Kobayashiら¹²⁾が、感作マウスの体温はマスト細胞上から放出されるヒスタミンによって低下すると報告している。自発運動量については、Jooら²⁷⁾が、長時間のアナフィラキシー症状の判定に回転式運動量測定装置を用いた自発運動量の測定が有用であると報告している。従って、直腸温と自発運動量を併用することでアレルギー投与、30分後のアナフィラキシー症状に加え、長時間のアナフィラキシー症状を評価できると考えた。

本研究で、グリアジン感作マウスにグリアジン画分を経口投与するとアナフィラキシー症状は投与量依存的に惹起されることが明らかとなった。Hanakawaら²⁹⁾は、WDEIA患者に誘発試験を行った結果、WDEIAのアレルギー症状は小麦製品の摂取量依存的に発症することを報告している。Matsubaraら³⁰⁾は、健康なマウスを用いて胃内投与した、卵白アレルギーの1つであるオボアルブミンの血中への移行が量依存的に増加することを報告している。本実験ではグリアジンの血中への移行を調べなかったが、グリアジン投与量依存的なアナフィラキシー症状の惹起は、グリアジンの吸収量が関係していると考えられた。それゆえ、グリアジンの経口投与量が、アナフィラキシー症状の惹起に関与している可能性は高いと思われる。

また本研究で、グリアジン感作マウスにグリアジンを投与、運動負荷するとアナフィラキシー症状は、低容量のグリアジンでも惹起されることが明らかとなった。Matsuoら⁸⁾は、WDEIAの誘発試験において継時的に採血を行い、小麦グリアジンの血中濃度を測定した。その結果、症状が誘発された時に血中アレルギー濃度が上昇していることを明らかにした。この血中アレルギー濃度の上昇は、小麦製品摂取のみで症状が誘発されなかったときにはほとんど認められなかったと報告している。我々は以前、

リゾチームで感作したマウスに、リゾチームを経口投与し、さらに運動負荷を与えると、小腸粘膜上皮細胞傷害が観察され、その結果、生体内へのアレルギーの取り込みに影響を与えることを報告した⁹⁾。さらに、3つの小麦タンパク質（塩溶性タンパク質画分、グリアジン画分、グルテニン画分）で感作したマウスにアレルギー投与、運動負荷する¹⁰⁾と、マウスの肝臓へのアレルギーの侵入は、塩溶性タンパク質群と比較しグリアジン群次いでグルテニン群で高く、小腸粘膜上皮組織の激しい損傷はグリアジン群で観察されることを報告した。また、Palosuoら³¹⁾はグリアジンの構成成分の1つである ω -5グリアジンのペプシン消化物はトランスグルタミナーゼの働きで重合物を形成する。この重合物はペプシン分解物より顕著にWDEIA患者血清IgEと結合すると報告した。ここで彼らは、運動による消化管のトランスグルタミナーゼの活性化により ω -5グリアジンが重合することでアレルギー活性が高くなると考察している。これらのことから、グリアジン及び運動負荷が小腸粘膜上皮組織に損傷を与え、その結果、グリアジンの吸収が促進され、より多く体内に吸収されたと推察される⁸⁻¹⁰⁾。それゆえ、通常安静にしていれば生じにくいアナフィラキシー症状が、微量のグリアジンの経口投与であっても運動を負荷することで発症してしまうものと考えられた。

結論として、感作マウスに0.1 mg、0.2 mg、0.4 mg、0.8 mgのグリアジン画分を経口投与後、30分間の安静もしくは運動負荷を行った。安静時のアナフィラキシー評価では、体温は非感作群と比較して0.8 mg投与群で有意な低下が認められ、自発運動量は0.4 mg投与群、0.8 mg投与群で有意に低下した。運動負荷によるアナフィラキシーは、0.1 mg投与群、0.2 mg投与群でも観察された。以上の結果から、グリアジン感作マウスにおけるアナフィラキシー症状は、アレルギー量依存的に惹起されるが、運動は低容量グリアジン投与によるアナフィラキシーの惹起を促進させると考えられた。

本研究は川崎医療福祉大学平成21年度医療福祉研究費により実施された。

文 献

- 1) Kemp SF, Lockey RF, Wolf BL and Lieberman P : Anaphylaxis. A review of 266 cases. *Archives of Internal Medicine*, **155**(16), 1749–1754, 1995.
- 2) Castells MC, Horan RF and Sheffer AL : Exercise-induced anaphylaxis (EIA). *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **17**(4), 413–424, 1999.
- 3) 原田晋, 堀川達弥, 市橋正光 : Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis (FDEIA) の本邦報告例集計による考察. アレルギー, **49**(11), 1066–1073, 2000.
- 4) 近藤直実, 大嶋勇成, 宇理須厚夫, 柴田留美子, 相原雄幸, 赤澤晃 : 食物依存性運動誘発アナフィラキシーに関する研究. 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業「食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質 (アレルゲン) の確定, 予防・予知法の確立に関する研究」海老沢元宏班 : 厚生労働科学研究H16年度研究報告書, p71–71, 平成17年3月.
- 5) Shewry PR, Tatham AS : The prolamin storage proteins of cereal seeds : structure and evolution. *Biochemical Journal*, **267**(1), 1–12, 1990.
- 6) Varjonen E, Vainio E and Kalimo K : Life-threatening, recurrent anaphylaxis caused by allergy to gliadin and exercise. *Clinical and Experimental Allergy*, **27**(2), 162–166, 1997.
- 7) Battais F, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, Moneret-Vautrin DA and Denery-Papini S : Food allergy to wheat : Identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy*, **33**(7) : 962–970, 2003.
- 8) Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, Niihara H, Hide M and Morita E : Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy*, **35**(4), 461–466, 2005.
- 9) Yano H, Kato Y and Matsuda T : Acute exercise induces gastrointestinal leakage of allergen in lysozyme-sensitized mice. *European Journal of Applied Physiology*, **87**(4-5), 358–364, 2002.
- 10) Kozai H, Yano H, Matsuda T and Kato Y : Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis in mice is caused by gliadin fraction and glutenin treatments. *Immunology Letters*, **102**(1), 83–90, 2006.
- 11) Engvall E and Perlmann P : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**(9), 871–874, 1971.
- 12) Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, Shirato K, Nagy A, Ujiike A, Takai T, Watanabe T and Ohtsu H : The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **110**(2), 298–303, 2002.
- 13) Liu X, Feng J, Xu ZR, Wang YZ and Liu JX : Oral allergy syndrome and anaphylactic reactions in BALB/c mice caused by soybean glycinin and beta-conglycinin. *Clinical and Experimental Allergy*, **38**(2), 350–356, 2008.
- 14) Simmons DG, Rose LP, McCorkle FM and Luginbuhl GH : Histamine-sensitizing factor of *Alcaligenes faecalis*. *Avian Diseases*, **27**(1), 171–177, 1983.
- 15) Dombrowicz D, Flamand V, Miyajima I, Ravetch JV, Galli SJ and Kinet JP : Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *Journal of Clinical Investigation*, **99**(5), 915–925, 1997.
- 16) Ujiike A, Ishikawa Y, Ono M, Yuasa T, Yoshino T, Fukumoto M, Ravetch JV and Takai T : Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *Journal of Experimental Medicine*, **189**(10), 1573–1579, 1999.
- 17) Srivastava KD, Kattan JD, Zou ZM, Li JH, Zhang L, Wallenstein S, Goldfarb J, Sampson HA and Li XM : The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **115**(1), 171–178, 2005.
- 18) Windbichler M, Echtenacher B, Takahashi K, Ezekowitz RA, Schwaebler WJ, Jensenius JC and Mannel DN : Investigations on the involvement of the lectin pathway of complement activation in anaphylaxis. *International Archives of Allergy and Immunology*, **141**(1), 11–23, 2006.
- 19) Kishida T, Hiromura Y, Shin-Ya M, Asada H, Kuriyama H, Sugai M, Shimizu A, Yokota Y, Hama T, Imanishi J, Hisa Y and Mazda O : IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice. *Journal of Immunology*, **179**(12), 8554–8561, 2007.
- 20) Roth-Walter F, Berin MC, Arnaboldi P, Escalante CR, Dahan S, Rauch J, Jensen-Jarolim E and Mayer L :

- Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy*, **63**(7), 882–890, 2008.
- 21) Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, Kim B, Wasserman S, Reed J, Coyle AJ and Jordana M : Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. *Journal of Immunology*, **179**(10), 6696–6703, 2007.
 - 22) Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H and Li XM : Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clinical and Experimental Allergy*, **38**(11), 1808–1818, 2008.
 - 23) Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrigo A, Bernardini D, Dam M and Leon A : A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story.... *Journal of Neuroendocrinology*, **1**, 26–34, 2008.
 - 24) Shiva D, Matsumoto T, Kremenik MJ, Kato Y and Yano H : High dose of lipopolysaccharide pre-treatment prevents OVA-induced anaphylactic decreases in rectal temperature in the immunized mice. *Immunology Letters*, **118**(1), 59–64, 2008.
 - 25) San Román B, Irache JM, Gómez S, Gamazo C and Espuelas S : Co-delivery of ovalbumin and CpG motifs into microparticles protected sensitized mice from anaphylaxis. *International Archives of Allergy and Immunology*, **149**(2), 111–118, 2009.
 - 26) Osterfeld H, Ahrens R, Strait R, Finkelman FD, Renauld JC and Hogan SP : Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**(2), 469–476, 2010.
 - 27) Joo K and Kato Y : Assessment of allergenic activity of a heat-coagulated ovalbumin after in vivo digestion. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70**(3), 591–597, 2006.
 - 28) Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI and Sampson HA : A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **103**(2 Pt 1), 206–214, 1999.
 - 29) Hanakawa Y, Tohyama M, Shirakata Y, Murakami S and Hashimoto K : Food-dependent exercise-induced anaphylaxis : a case related to the amount of food allergen ingested. *British Journal of Dermatology*, **138**(5), 898–900, 1998.
 - 30) Matsubara T, Aoki N, Honjoh T, Mizumachi K, Kurisaki J, Okajima T, Nadano D and Matsuda T : Absorption, migration and kinetics in peripheral blood of orally administered ovalbumin in a mouse model. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**(10), 2555–2565, 2008.
 - 31) Palosuo K, Varjonen E, Nurkkala J, Kalkkinen N, Harvima R, Reunala T and Alenius H : Transglutaminase mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **111**(6), 1386–1392, 2003.

(平成22年11月25日受理)

Dose Effect of Gliadin on Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis in Mice

Mamoru TANAKA, Hiromi YANO, Sakuo YAMADA and Takao NAGANO

(Accepted Nov. 25, 2010)

Key words : wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis, gliadin, B10.A mice, dosages

Abstract

In this study, dose effects of gliadin on wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis were investigated using a mouse model. Four-week-old B10.A mice were sensitized with gliadin/ alum by intraperitoneal injection. The specific anti-gliadin IgE in serum was evaluated by ELISA. To assess the anaphylaxis symptoms, rectal temperature and voluntary physical activity were examined. The sensitized mice were orally challenged with 0.1 mg, 0.2 mg, 0.4 mg or 0.8 mg gliadin fraction, and then treated with or without forced runs on a treadmill for 30 min (15 m/min and 20% gradient). After the exercise, rectal temperature was examined and then voluntary physical activity was also monitored. The amount of gliadin-specific IgE in sensitized mice was significantly higher than that in the unsensitized group. In non exercise conditions, the rectal temperature in sensitized mice was significantly decreased by 0.8mg gliadin ingestion. In addition, both 0.4mg and 0.8mg gliadin injections significantly decreased the voluntary physical activity. In contrast, exercise treatment induced the anaphylaxis symptoms in both 0.1 mg and 0.2 mg ingested mice. These results suggest that gliadin induced anaphylaxis depends on the amount of gliadin ingestion in sensitized mice. Furthermore, exercise might accelerate low dose gliadin induced anaphylaxis.

Correspondence to : Takao NAGANO

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-Mail : naganot@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.20, No.2, 2011 397 – 404)